

## VB12 Vitamin B12 (CLIA)

### Use previsto

Inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación cuantitativa de vitamina B12 (VB12) en suero o plasma

### Significación clínica

La vitamina B12, también denominada cobalamina, es la denominación de un grupo de compuestos vitamínicos que contienen cobalto, metilcobalamina, 5-deoxiadenosina cobalamina, cianocobalamina, por ejemplo. La forma predominante en el suero es la metilcobalamina, mientras la forma celular predominante es la 5' desoxiadenosilcobalamina. La cianocobalamina es la forma más estable que se usa como un compuesto de referencia para medir las concentraciones de cobalamina sérica.

Las cobalaminas se obtienen principalmente de productos de origen animal como carne, huevos, leche y otros productos lácteos. Cuando se ingiere, la VB12 se vincula con el factor intrínseco en el estómago y luego es absorbida en el íleon. Una vez absorbida, la VB12 será transportada al hígado.

La VB12 es una coenzima que participa en dos vías metabólicas: 1) la síntesis de metionina a partir de la homocisteína, y 2) la conversión de metilmalonil CoA a succinil CoA. Deficiencia de VB12 generará anemia megaloblástica (MA) y problemas neurológicos severos. La relación entre los niveles de VB12 y MA no siempre está clara, ya que algunos individuos con MA tendrán niveles normales de VB12 y, por el contrario, muchos individuos con deficiencia de vitamina B12 no padecen MA. Para diagnosticar si la VB12 se encuentra deficiente, los pacientes con síntomas de anemia deberían ser evaluados con las pruebas para homocisteína y ácido metilmalónico.

La VB12 está estrechamente relacionada con el metabolismo del ácido fólico. La deficiencia de VB12 impide la transformación de 5'-N-metil-ácido tetrahidrofólico en ácido tetrahidrofólico, lo que tiene como consecuencia la disminución de la capacidad de síntesis de ADN. Teniendo en cuenta esto, es necesario medir tanto la VB12 como el ácido fólico en una evaluación clínica.

Pueden causar deficiencia de VB12: el vegetarianismo, la gastrectomía parcial, el embarazo, los anticonceptivos orales, la edad avanzada, los autoanticuerpos y la mutación de genes asociados a la absorción o transporte de VB12. La elevación de los niveles séricos de VB12 tiene como consecuencia, entre otras, insuficiencia renal, enfermedad hepática y enfermedades mieloproliferativas.

### Fundamentos del método

**Vitamin B12 (CLIA)** es un inmunoensayo competitivo con pretratamiento de muestra automatizado para la determinación cuantitativa de VB12 en suero o plasma.

En el primer paso se agrega a una cubeta de reacción la muestra, el reactivo de pretratamiento 1 (PT1) y reactivo de

pretratamiento 2 (PT2). Luego de la incubación la VB12 es liberada de su proteína transportadora.

En el segundo paso, la muestra pre-tratada se transfiere a una nueva cubeta de reacción y se incubaba con el conjugado de factor intrínseco-fosfatasa alcalina. Luego de la incubación, la VB12 de la muestra se une al conjugado.

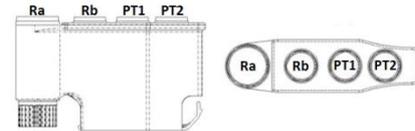
En el tercer paso, se agregan las partículas paramagnéticas cubiertas con VB12 biotinilada, produciéndose una unión competitiva con el conjugado factor intrínseco-fosfatasa alcalina. Luego de la incubación las micropartículas se capturan magnéticamente. Las sustancias no unidas se remueven por lavado.

Por último, se añade la solución de sustrato (Substrate Solution) a la cubeta de reacción. La reacción quimioluminiscente producida por el conjugado se mide como unidades relativas de luz (RLU). La cantidad de VB12 presente en la muestra es inversamente proporcional a la RLU generadas durante la reacción. La concentración de VB12 se determina mediante una curva de calibración.

### Reactivos provistos

Ra	Micropartículas paramagnéticas recubiertas con VB12 en buffer TRIS.
Rb	Conjugado de factor intrínseco y fosfatasa alcalina en buffer PBS.
PT1	Ditiotritol en buffer de citrato de sodio.
PT2	Ferricianuro de potasio en hidróxido de sodio.

La posición de los componentes del kit se muestra en la siguiente figura:



### Reactivos no provistos

- VB12 Calibrators
- Metabolic Multi Control (L)
- Metabolic Multi Control (H)
- Wash Buffer
- Substrate Solution

Estos reactivos son provistos separadamente por Wiener lab.

### Instrucciones para su uso

Los reactivos son listos para usar

### Precauciones

- Para uso diagnóstico "in vitro".
- Mantener el kit de reactivos en posición vertical para asegurar que no se pierdan micropartículas antes del uso.
- No utilizar reactivos de otro origen.
- No utilizar reactivos después de la fecha de vencimiento.

- No intercambiar reactivos de distintos lotes.
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Utilizar los reactivos respetando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio bioquímico.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

### Estabilidad e instrucciones de almacenamiento

El kit es estable a 2-8°C hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

### Material requerido (no provisto)

Analizador de quimioluminiscencia Wiener lab. CLIA series

### Muestra

Suero o plasma

**a) Recolección:** obtener la muestra de la manera habitual. No utilizar muestras fuertemente hemolizadas ni inactivadas por calor.

**b) Aditivos:** en caso de utilizar plasma se recomienda el uso de EDTA, heparina sódica o heparina de litio como anticoagulantes.

**c) Centrifugar** las muestras y separar el suero o plasma antes de las dos horas.

**d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** las muestras deben ser preferentemente frescas. Si no se procesan dentro de las 8 horas posteriores a la recolección, las muestras deben conservarse a 2-8°C. De esta manera, son estables hasta 48 horas refrigeradas a 2-8°C, o hasta 2 meses congeladas a -20°C o menos.

Evitar los ciclos de congelado y descongelado.

### Procedimiento

Antes de cargar los reactivos en el analizador se debe invertir suavemente el frasco de reactivos sin abrir por lo menos 30 veces para resuspender las micropartículas sedimentadas durante el almacenamiento. Realizar una inspección visual del frasco para asegurar la resuspensión de las micropartículas. Si las mismas continúan adheridas al frasco, seguir invirtiéndolo hasta su resuspensión completa. Si aún así las micropartículas no se resuspenden, se recomienda desechar el frasco.

El ensayo requiere 50 µL de muestra. En este volumen no se incluye el volumen muerto del contenedor de muestras.

### Calibración

El kit **Vitamin B12 (CLIA)** de Wiener lab. ha sido estandarizado con un ensayo comercial de VB12 (CLIA).

La información específica de la curva maestra de calibración está contenida en el código bidimensional provisto. Se utiliza junto con los calibradores para la calibración del lote de reactivo específico. Al realizar la calibración, se debe escanear primero la información de la curva maestra de calibración del código bidimensional en el sistema. A continuación,

utilizar los calibradores a tres niveles. Se requiere una curva de calibración válida antes de cualquier prueba de VB12. Se recomienda una recalibración cada 4 semanas, cuando se utilice un nuevo lote de reactivos o los controles de calidad no se encuentren dentro de los intervalos especificados. Para obtener información detallada sobre la calibración, consulte el manual de funcionamiento del analizador.

### Control de calidad

**Metabolic Multi Control (L) y Metabolic Multi Control (H)** de Wiener lab.

### Cálculo de los resultados

El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra a partir de la curva maestra de calibración leída del código bidimensional y un ajuste de la curva logística de 4 parámetros (4PLC) con las RLU generadas por los 3 niveles de calibradores. Los resultados se muestran en pg/mL.

Factores de conversión:

pmol/L x 1,36 = pg/mL

pg/mL x 0,738 = pmol/L

### Valores esperados

En un estudio realizado sobre una población de 138 individuos sanos se obtuvo el siguiente intervalo de referencia:

Categoría	Número de muestras	Percentilo 2,5-97,5%
Individuos sanos	138	180-916 pg/mL

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.

### Limitaciones del procedimiento

El límite superior del ensayo es de 2000 pg/mL. Se puede determinar cuantitativamente una muestra con una concentración de VB12 inferior al límite superior, pero una muestra con una concentración mayor que el límite superior se informará como >2000 pg/mL.

La concentración de VB12 en una muestra ensayada con distintos kits comerciales, puede variar debido a diferencias en los métodos de ensayo, calibración y especificidad de los reactivos. Los resultados del ensayo se deben utilizar junto con otros datos, como síntomas, resultados de otras pruebas, historia clínica, etc.

Muestras de individuos expuestos a anticuerpos monoclonales de ratón pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). Estas muestras pueden mostrar valores falsamente elevados o bajos con kits que utilicen anticuerpos de ratones monoclonales. Sin embargo, no se observaron interferencias evidentes de HAMA en este ensayo.

### Performance

**a) Sensibilidad analítica:** ≤ 50 pg/mL

**b) Rango de medición:** 50-2000 pg/mL.

### c) Especificidad:

- No se observan interferencias por hemoglobina

hasta 1000 mg/dL, bilirrubina hasta 60 mg/dL, triglicéridos hasta 1500 mg/dL, proteínas totales hasta 9,0 g/dL, factor reumatoide hasta 200 UI/mL ni anticuerpo antinuclear.

- El calibrador C0 de **VB12 Calibrators** se enriqueció con dicianocobinamida. No se observó reactividad cruzada significativa ya que todos los resultados fueron  $\leq 0,5\%$ . Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Sustancia	Concentración (ng/mL)	Reactividad cruzada
dicianocobinamida	200	0,11%

**d) Exactitud:**

Se usaron dos controles con valores trazables y predefinidos para verificar la exactitud de este ensayo. Los resultados demostraron que las desviaciones relativas eran inferiores a  $\pm 10\%$ . Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestra	VB12 medida (pg/mL)	VB12 predefinida (pg/mL)	Desvío relativo
Nivel 1	243,55	252,19	-3,43%
Nivel 2	630,58	608,61	3,61%

**e) Precisión:**

La precisión se determinó mediante el protocolo EP5-A2 del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Se probaron dos niveles de controles de calidad por duplicado en dos series independientes por día, durante un total de 20 días.

Muestra	Valor medio (pg/mL)	CV intraensa yo	CV interensa yo	CV total
1	251.24	3.63 %	2.07 %	3.68 %
2	600.01	3.56 %	2.21 %	3.56 %

**f) Linealidad:** la reacción es lineal entre 50 y 2000 pg/mL

**g) Correlación:**

El ensayo de **Vitamin B12 (CLIA)** de Wiener lab. se comparó con un kit de diagnóstico disponible comercialmente en un estudio de correlación con unas 306 muestras de suero. Los datos estadísticos obtenidos se resumen en la siguiente tabla.

Intervalo de Concentración (pg/mL)	Pendiente	Intersección	Coefficiente de correlación
50 ~ 2000	0,9932	5,6632	0,9917

**Presentaciones**

- 2 x 50 tests (cód. 1001183)
- 2 x 100 tests (cód. 1001184)

**Referencias**

- Nelson DA y Davey FR. In Clinical

diagnosis and management by laboratory methods. Erythrocytic disorders 1991; 627-635.

- Chararin I. Megaloblastic Anemia, Cobalamin y Folate. J Clin Pathol 1987; 40:978-84.
- Hoffbrand AV. Vitamin B12 and folate metabolism: the megaloblastic anaemias and other nutritional anaemias. In Blood and its disorders, 1982; 199-263.
- Beuerlein FJ. Testing Strategies for Anemias. Lab Mgmt 1988; dic:23-9.
- Klee GC. Cobalamin and Folate Evaluation: Measurement of Methylmalonic Acid and Homocysteine vs. Vitamin B12 and Folate. Clin Chem 46; 2000:1277-83.
- Snow CF. Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 and Folate Deficiency: A Guide for the Primary Care Physician. Arch Intern Med. 1999; 159:1289-98.
- Carethers M. Diagnosing Vitamin B12 Deficiency, A Common Geriatric Disorder. Geriatrics 1988; 43(3):89-112.
- Herbert V. Five Possible Causes of All Nutrient Deficiency: Illustrated by Deficiencies of Vitamin B12 and Folic Acid. Am J Clin Nutr 1973; 26:77-86.
- Pratt JJ, Woldring MG. Radioassay of Vitamin B12 and Other Corrinoids. Methods Enzymol 1982; 84:369-406.
- Boscatto LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988; 34:27-33.
- Kricka L. Interferences in immunoassays - still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037-1038.
- Bjerner J y otros. Immunometric assay interference: incidence and prevention. Clin Chem 2002; 48: 613-621.

Fecha de caducidad

Número de catálogo

Riesgo biológico

Contenido

SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.  
Mindray building, Keji 12th Road South. Hi-tech Industrial Park.

Fabricado para:  
Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com>  
Producto Autorizado por A.N.M.A.T.  
PM-1102-145.  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica

**SÍMBOLOS**

Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

Representante autorizado en la Comunidad Europea

Elaborado por

Uso diagnóstico "in vitro"

Consultar instrucciones de uso

Este lado arriba

Límite de temperatura (conservar a)

Número de lote